

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORLED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-96610

Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

④公開 昭和60年(1985)5月30日

C 08 F 220/56  
C 07 H 21/02

7252-4C※

審査請求 有 発明の数 2 (全8頁)

⑧発明の名称 ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチドホスフェートを結合した高分子物質

②特 願 昭58-204269

②出 願 昭58(1983)10月31日

特許法第30条第1項適用 昭和58年10月1日 社団法人日本醸造工学発行の昭和58年度日本醸造工学大会講演要旨集において発表

①発 明 者 荒 木 宏 之 町田市旭町三丁目5番1号 電気化学工業株式会社中央研究所内

②発 明 者 山 崎 幸 苗 茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内

③出 願 人 工 業 技 術 院 長

④指定代理人 工業技術院微生物工業技術研究所長  
最終頁に続く

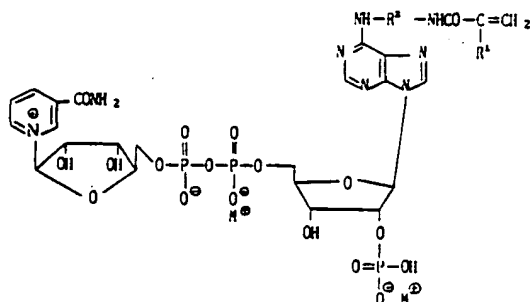
# 明 細 書

## 1. 発明の名称

ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチドホスフェートを結合した高分子物質

## 2. 特許請求の範囲

(1)アクリルアミドと、一般式

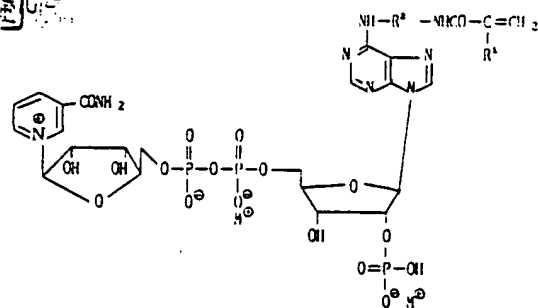


(式中、R<sup>1</sup> は水素又はメチル基、R<sup>2</sup> は炭素数5～10個の炭素鎖、又はその中間にアミド結合又はエーテル結合を有する炭素鎖であり、該炭素鎖には含酸素基が結合していてもよく、Mは陽イオンである)

で表わされる重合性のニコチンアミド-アデニン

ジヌクレオチドホスフェート誘導体とをラジカル共重合して得られる高分子物質。

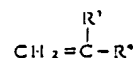
(2)アクリル酸アミドと、一般式



(式中、R<sup>1</sup> は水素又はメチル基、R<sup>2</sup> は炭素数5～10個の炭素鎖、又はその中間にアミド結合又はエーテル結合を有する炭素鎖であり、該炭素鎖には含酸素基が結合していてもよく、Mは陽イオンである)

で表わされる重合性のニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチドホスフェート誘導体と、

一般式



(式中、 $R^1$  は水素又はメチル基、 $R^2$  は $-COOH$ (

$N$ は陽イオンである)又は $-CONH-R^2$ 、 $-N(R^2)_2$ ( $R^2$ は炭素数1~5個の炭素鎖又は中間にアミド結合又はエーテル結合を有する炭素鎖であり、該炭素鎖には含酸素基が結合していてもよく、 $R^2$ 及び $R^2$ は水素、メチル基又はエチル基であり、同一又は異つていてもよく、またアミノ基 $-N(R^2)_2$ は酸付加塩を形成していてもよい)

で表わされるイオン性基を有する重合性化合物とをラジカル共重合して得られる高分子物質、

### 3. 発明の詳細な説明

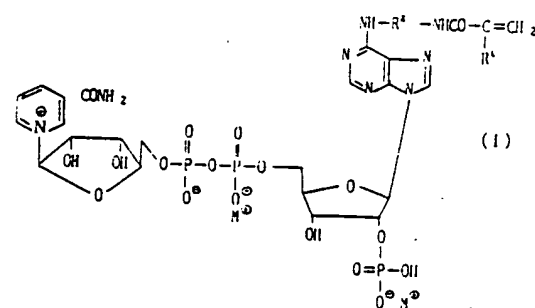
本発明は、ニコチンアミド-アデニンジスクレオチドホスフェートを結合した新規な高分子物質に関するものである。

酵素反応にあたって補酵素としてニコチンアミド-アデニンジスクレオチドホスフェート(以下単にNADPと略記する)を要求する酵素を用いる酸化還元反応を工業的に実施するためには、高

NADPを反応系内に保持し、繰り返し使用をすることが経済的見地からは不可欠である。この解決のためには、NADPを高分子物質に結合した高分子と酵素を含む反応液を限外濾過膜あるいはホローファイバーを有する反応器中に入れて、連続使用するシステムが効果的であることが知られている。しかし、これまでにNADPを結合した高分子物質の研究・開発は、国内外において数少なく、これらのものは、デキストラン(Eur. J. Biochem., 49, 511(1974))、ポリエチレニミン(Eur. J. Biochem., 72, 309(1977))、セファロース(Arch. Biochem. Biophys., 168, 665(1975))などの既製の高分子にNADPを結合させた高分子物質である。これらの合成法は、NADPにあらかじめ末端に官能基を有する適当な長さの有機基を導入後、その官能基を用いて当該高分子に結合させるというものである。これらの例では、ポリエチレニミンとの結合時に高価なカルボジイミドを使用(Eur. J. Biochem., 72, 309(1977))したり、比較的安価であるが、結合の切れやすいBrCN法によりデキスト

ランあるいはセファロースに結合(Eur. J. Biochem., 49, 511(1974), Arch. biochem. Biophys., 168, 665(1975))しているため、工業的見地からは、実用性のあるものとは到底言い難い。また、BrCN法による場合は結合収率は明記されていないが、相当低いものと推察される。一方、ポリエチレニミンへの結合の場合には、比較的高い結合収率でNADPが高分子に結合されているが、その補酵素活性をみると、もとのNADPの場合に比べて36%にとどまるという低さである。従つて、NADPを結合した高分子について、安価な試薬を用いて簡単に合成でき、その結合は強固であり、しかも高い補酵素活性を有する高分子の満足なものは未だに得られておらず、その開発が要望されていた。本発明者らは、このような要望に応えるべく鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至つた。

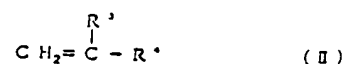
即ち、本発明は、アクリルアミドと、一般式



(式中、 $R^1$  は水素又はメチル基、 $R^2$  は炭素数5~10個の炭素鎖、又はその中間にアミド結合又はエーテル結合を有する炭素鎖であり、該炭素鎖には含酸素基が結合していてもよく、 $N$ は陽イオンである)

で表わされる重合性のニコチンアミド-アデニンジスクレオチドホスフェート誘導体とをラジカル共重合して得られる高分子物質が提供される。

また、本発明によれば、アクリルアミドと、前記一般式(I)で表わされる重合性のNADP誘導体と、一般式

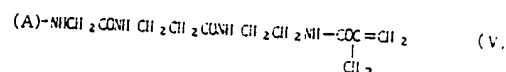




ここで、水溶性の高分子物質として得られるが、この共重合体の製造に際しては、原料NADP誘導体が70%以上の結合収率で高分子化し得ることが高速液体クロマトグラフィーから明らかにされた。本発明の高分子物質は、ラジカル共重合反応によつて、得られるのであるから、ラジカル共重合反応の常として、各モノマーの配列のしかたは不規則である。従つて式(III)における上記くり返し単位を改むす $q$ 、 $m$ 、 $n$ 、 $p$ の値は、本発明高分子物質の各部において、全く不規則な値をとつているものとみなされる。ただし、 $q+n$ と $m$ と $p$ の比(すなわち、くり返し単位の組成比)は、重合反応を行うにあつて仕込む各モノマーの濃度比を選ぶことによつて調節することが可能であり、その値 $((q+n):m:n)$ は10:1:0から500:1:100程度までの適当な値をとることができる。分子量に関しては、これもラジカル重合反応の常として分子量分布がかなり広がるが、開始剤の濃度を選択することによつて、平均分子量を制御することができる。後述する開始剤の条件を選ぶことによつ

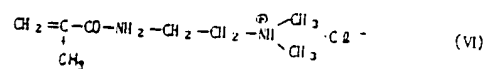
て平均分子量が数千から数十万のものまで種々の平均分子量の共重合高分子を合成することができ、補酵素活性の点からは、重量平均分子量を1万程度にすることが望ましい。このようなものを得るための具体的な反応条件は実施例において述べられている。

本発明の共重合体の特徴は、各種のデヒドロゲナーゼに対して高い補酵素活性を有し、高い結合収率で補酵素を結合させ得ることである。また、たとえば式(V)

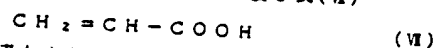


(式中、(A)はアデニン核のN<sup>6</sup>位の部分以外のNADP骨格を示す)

で表わされる化合物と、アクリルアミドとの共重合体(PA-Vと略記する)は、酵母のグルタミン酸デヒドロゲナーゼに対して、最大速度と比較して、元のNADP自体の117%という高い補酵素活性を示す。また、式(V)で表わされる重合性のNADP誘導体と、アクリルアミド及び式(VI)



で表わされる重合性化合物との共重合体(PA-V-VI)は、牛肝臓のグルタミン酸デヒドロゲナーゼに対して、NADPと比較して100%の補酵素活性を示す。このように、高分子類中にカチオン性官能基を導入することにより、高い活性を示す酵素もあり、本発明による共重合高分子は、その高分子類中に自由に荷電を与え得る特徴を有している。また、ミカエリス定数に関しては、重合性NADP誘導体(V)とアクリルアミド及び式(VI)



で表わされるアクリル酸との共重合体(PA-V-VII)では高分子中に含まれる活性はNADP濃度として表すと各酵素デヒドロゲナーゼに対して0.5mM以下という小さな値であつた。なお、ミカエリス定数とは、酵素反応において最大速度の半分の速度を示す基質又は補酵素の濃度であり、この値が小さい程、より稀薄な濃度においても十分に作用し得ることを意味するものであり、また稀薄な濃度で高分子を加えることにより、反応液の粘度上昇を抑制できる利点がある。このように、本発明の

重合は、使用する酵素に応じた望ましい荷電を自由に高分子類中に導入することにより高い活性や低いミカエリス定数を有する高分子を合成できる点において独特かつ優れたNADP結合法といふことができる。さらに、アクリルアミドとの共重合体以外的高分子と比べても、従来報告されているNADPを結合した高分子よりも、本発明による高分子の方がほとんどの酵素に対して補酵素活性が高い。例えば、前述のデキストラン結合NADPのグルタミン酸デヒドロゲナーゼに対する活性は、NADPのわずかに15%にすぎず、また、ポリエチレンジアミン結合NADPの場合においても23%であるのに対し、PA-V-VIのこの酵素に対する活性は、既に述べたようにNADPの100%のものほる。

更に、本発明による高分子においては、NADPと高分子本体との間の結合は、その構造からわかるように安定であり、前述のデキストランへの結合体(Eur. J. Biochem., 49, 511(1974))の如く、徐々に加水分解されて、結合していたNADPを失うようなことはない。

こと述べた如く、本発明による共重合高分子は、NADPを結合した高分子として、酵素活性、結合能及び結合の安定性などの諸点において、また、高分子によつては高分子類中に望ましい荷電を自由に持たせる点など、従来のものよりもすぐれた高分子である。

本発明による共重合高分子の利用法としては、デヒドロゲナーゼと共に限外濾過器あるいはホローファイバースステムに入れ、基質液を流して行う逆酸化還元反応が挙げられる。NADPは高分子に結合体となつてゐるため、限外濾過膜を通過あるいは、ホローファイバース外へ漏出することができず、反応器の中に保持され、繰り返し使用される。このようにして、高価なNADPを基質液に添加するという経済上の不利を避けることができる。この場合、使用するデヒドロゲナーゼはいかなるものでもよく、例えば、ステロイドデヒドロゲナーゼなど、高価な医薬品の前駆体を目的物に変換する酸化還元酵素などが考えられる。

本発明による共重合高分子の合成は次のように

して行う。先ず、アクリルアミドと式(1)で表わされる重合性NADP誘導体、あるいは、アクリルアミドと式(1)で表わされる重合性NADP誘導体と式(II)で表わされる重合性単量体及び重合開始剤を水に溶かし、チツ素ガスを吹き込みながら2時間ないしそれ以上攪拌する。場合によつては一夜ないしそれ以上放置し、反応の完結をはかる。温度は、NADPの分解をきたさない限りどのような温度でもよく、通常は4〜50℃とする。重合開始剤としては、 $K_2S_2O_8$  -  $NaHSO_3$  又は、 $K_2S_2O_8$  - ジメチルアミノプロピオニトリル系などの公知のラジカル重合開始剤が用いられるが、平均分子量の制御の点からは $K_2S_2O_8$  -  $NaHSO_3$  の系が好ましい。反応液中の温度は一般に次の通りである。アクリルアミドは50〜500mM、NADP誘導体は0.1〜100mM、これら以外に添加する重合性単量体は0.1〜200mMとする。 $K_2S_2O_8$  は0.5〜100mM、 $NaHSO_3$  は0.5〜100mMであり、ジメチルアミノプロピオニトリルを用いる場合は、このものの温度は0.5〜500mMとする。これらの化合物の温度、特

にアクリルアミドと開始剤の濃度比が温度の影響の下で、生成する共重合高分子の平均分子量を決定する。上記条件においては、平均分子量が数千のものから数十万のものまでの種々の平均分子量の共重合高分子を合成できることは公知の通りである。また、酵素の種類によつては、高分子類中に荷電を有した場合が良いこともあり、用いる酵素に応じて自由に荷電モノマー(前記一般式(II)に相当する重合性化合物)を組み入れることができる。次にpHは、NADPの分解をきたさない限りどのようなpHでもよいが、通常2〜9の範囲で、好ましくはpH5〜6の微酸性とする。反応後は、ゲル濾過や透析により未反応モノマーや開始剤を除いた後、その水溶液を凍結乾燥すると白色固形の高分子を得る。また、水溶液を濃縮し、炭状残渣にアセトンを加え、生じた白色固形物を減圧乾燥しても、目的物を得ることができる。

次に本発明を実施例により更に詳細に説明する。

#### 実施例 1

$N^{\circ}$  - (N-(2-[N-(2-メタクリルアミドエ

チル)カルバモイル]エチル)カルバモイルメチル)-NADP 0.68gを少量の水に溶解し、0.4N LiOHで中和した後、アクリルアミド4.27gを水に溶解して加え、更に水を加えて全容を250mlとした。この溶液を脱気した後、チツ素置換し、 $K_2S_2O_8$  1.2gを36.5mlの水に溶解し、 $NaHSO_3$  0.45gを4.3mlの水に溶解したものをそれぞれ加え、再び減圧脱気し、系内をチツ素置換して重合を開始した。反応は室温で3時間、ゆるやかに攪拌しながら行ない、反応終了液を濃縮し、ゲルろ過(セファデックスG-50)を行なつた後、セルロース透析チューブにより透析を行なつた。透析内液を凍結乾燥することにより、白色固体3.0g(重量基準の収率61%)を得た(PA-V)。全リン分析により、この高分子にはNADPが $130 \mu\text{mol/g}$  - 乾燥ポリマーの割合で結合されており、結合収率は53%であり、グルコース-6-リン酸とグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼによる340nmにおける吸光度増加の測定から算出されたNADPの結合量は $73 \mu\text{mol/g}$  - 乾燥ポリマーで、結合収率は42%であつた。ま

た、このPA-Vの重量平均分子量の測定は、NADPに類似の化合物であるATPの重合性誘導体 ( $N^+ - (N - [2 - (N - (2 - \text{メタクリルアミドエチル})\text{カルバモイル})\text{エチル}] \text{カルバモイルメチル}) - \text{ATP}$ ) と本発明で用いるアクリルアミドモノマーとを、前記と同様に共重合させて高分子物質を得、これを大型のゲル濾過クロマトグラフィーによつて分離し、各分画の高分子の重量平均分子量を光散乱法によつて測定し、次いでこの標準高分子を東洋ソーダ製G3000SVカラム (7.5mmφ×60cm) にかけて、その結果から作製した検量線に照らし合わせるにより行なつた。PA-Vの重量平均分子量は約9500であつた。また、全リン量分析から、くり返し単位の組成比 (一般式IIIにおける $a+n$ と $m$ との比) は170:1であつた。

#### 実施例 2

$N^+ - (N - [2 - (N - (2 - \text{メタクリルアミドエチル})\text{カルバモイル})\text{エチル}] \text{カルバモイルメチル}) - \text{NADP}$  45mgとN,N-ジメチル(2-メタクリルアミドエチル)アンモニウムクロライド71mg及びアクリルアミド320mgを全容11.3mlとして、実施例1と同様に処理し、K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 23mg及びNaHSO<sub>3</sub> 9mgを加えることにより反応を開始させた。反応終了液はゲル濾過、限外濾過装置 (アミコン製8MC) を用いて精製した後、凍結乾燥して白色固体0.31g (重量基準の収率71%) を得た (PA-V-VI)。全リン量分析より、結合度61μmol/g-乾燥ポリマー、結合収率39%のNADPが結合されており、前記酵素からの結合度及び結合収率はそれぞれ、52μmol/g-乾燥ポリマー、47%であつた。PA-V-VIの重量平均分子量は約30000であり、また全リン量分析と3級アミノ基の定量により、くり返し単位の組成比 (一般式IIIにおける $a+n$ と $m$ と $p$ との比) は200:1:20であつた。

特開昭60-96610(6)  
アクリルアミド320mgを全容11.3mlとして、実施例1と同様に処理し、K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 23mg及びNaHSO<sub>3</sub> 9mgを加えることにより反応を開始させた。反応終了液はゲル濾過、限外濾過装置 (アミコン製8MC) を用いて精製した後、凍結乾燥して白色固体0.31g (重量基準の収率71%) を得た (PA-V-VI)。全リン量分析より、結合度61μmol/g-乾燥ポリマー、結合収率39%のNADPが結合されており、前記酵素からの結合度及び結合収率はそれぞれ、52μmol/g-乾燥ポリマー、47%であつた。PA-V-VIの重量平均分子量は約30000であり、また全リン量分析と3級アミノ基の定量により、くり返し単位の組成比 (一般式IIIにおける $a+n$ と $m$ と $p$ との比) は200:1:20であつた。

#### 実施例 3

$N^+ - (N - [2 - (N - (2 - \text{メタクリルアミドエチル})\text{カルバモイル})\text{エチル}] \text{カルバモイルエチル}) - \text{NADP}$  45mgとアクリル酸32mg及びアクリルアミド320mgを全容22.5mlとして、実施例1と同様に処理し、K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 91mg及びNaHSO<sub>3</sub> 35mgを加えた

実施例2と同様に処理して白色固体0.21g (重量基準の収率53%) を得た (PA-V-VII)。全リン量分析より結合量、結合収率はそれぞれ58μmol/g-乾燥ポリマー及び25%であり、また前記酵素からの結合度、結合収率はそれぞれ54μmol/g-乾燥ポリマー及び33%であつた。重量平均分子量は約9000であり、また全リン量分析とカルボキシル基の定量より、くり返し単位の組成比 (一般式IIIにおける $a+n$ と $m$ と $p$ との比) は220:1:20であつた。

#### 実施例 4

$N^+ - ((2 - \text{ヒドロキシ}-3 - \text{メタクリロイルアミノプロピル})\text{カルバモイルメチル})\text{カルバモイルメチル}) - \text{NADP}$  27mgとN,N-ジメチル(2-メタクリルアミドエチル)アンモニウムクロライド26mg及びアクリルアミド192mgを全容6.8mlとして実施例1と同様の処理を行なつた。透析内液を濃縮し、冷アセトン (-20℃) を大量に加えることにより白色固体107mg (重量基準の収率44%) を得た (PA-VIII)。全リン量分析より結合量、結合収率は

それぞれ130μmol/g-乾燥ポリマー及び43%であり、また前記酵素からの結合度、結合収率はそれぞれ120μmol/g-乾燥ポリマー及び43%であつた。重量平均分子量は約50000であり、また全リン量分析と三級アミノ基の定量により、くり返し単位の組成比 (一般式IIIにおける $a+n$ と $m$ と $p$ との比) は82:1:5であつた。

#### 実施例 5

(グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼに対する活性の測定)

100mMのトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン-塩酸緩衝液 (pH7.2) 中に、グルコース-6-リン酸1.2mM、硫酸マグネシウム7.8mM及びPA-V、PA-V-VIもしくはPA-V-VIIを結合NADP濃度として0.3mMから0.0375mMの濃度で含む基質液 (全量1.24ml) を調製し、30℃に保温下、0.64μg酵素蛋白質量のロイコノストック・メセンテロイデス・グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (西独ベーリンガー社製) を含む4μlの酵素液を添加して反応を開始させた。反応の進行は、340nmにおけ

特開昭60- 96610(7)

の増加を随時的にレコーダーに記録させることによつて追跡した。このようにして、結合した酵素における初速度を測定し、これから、酵素の酵素反応における最大速度を算出した。酵素で測定したNADPの最大速度を100%とするときPA-V、PA-V-VIの最大速度はそれぞれ47.1%であった。

#### 実施例 5

実施例5で示した基質液(1.24ml)を、30℃に保ち、0.29μg酵素蛋白質量の酵母を起源とするグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを含む4μlの酵素液を添加して反応を開始させた。反応の進行は、340nmにおける吸光度の増加によつて追跡した。PA-Vの最大速度はもとのNADPを100%とすると、116%を示した。

#### 実施例 7

0.393Mトリエタノールアミン・塩酸塩-水酸化ナトリウム緩衝液(pH8.5)中に、L-グルタミン酸5.7mM及びPA-V、PA-V-VI又はPA-V-VIIを含むNADPの濃度として0.3~0.0188mMの濃度で含

む基質液(全量1.24ml)を調整し、13μg酵素蛋白質量の酵母を起源とするグルタメートデヒドロゲナーゼ(オリエンタル酵母社製)を含む4μlの酵素液を添加して反応を開始させた。反応の進行は、340nmにおける吸光度の増加により追跡した。PA-VのNADPの最大速度に対する割合は117%に達した。

#### 実施例 8

実施例7で示した基質液(1.24ml)を30℃に保温下、44μg酵素蛋白質量の牛肝臓を起源とするグルタメートデヒドロゲナーゼ(西独ベーリンガー社製)を含む4μlの酵素液を添加して反応を開始させた。反応の進行は340nmにおける吸光度の増加により追跡した。PA-V-VIのNADPに対する最大速度は100%を示した。

特許出願人 工業技術院 川 田 裕  
指定代理人 工業技術院微生物工業技術研究所 高 原 隆



第1頁の続き

⑨Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

/(C 08 F 220/56  
220:60)

7308-4J

⑩発 明 者 前 田

英 勝

茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内



手続補正書 (自発)

昭和59年2月9日

特開昭60-96610(8)

1、明細書第3頁下から第3行目の「ジヌクレオチドホスフェ」を「ジヌクレオチドホスフェート」に訂正します。

特許庁長官宛

- 1、事件の表示 昭和58年特許第204269号
- 2、発明の名称 ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチドホスフェートを結合した高分子物質
- 3、補正をする者  
事件との関係、特許出願人  
住 所 東京都千代田区森が岡1丁目3番1号  
氏 名 (114) 工業技術院 川 田 裕 郎
- 4、指定代理人  
住 所 茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3号  
氏 名 工業技術院微生物工業技術研究所長  
大 山 隆 夫
- 5、補正命令の日付 自 発
- 6、補正により増加する発明の数 な し
- 7、補正の対象 明細書の「発明の詳細な説明」の項
- 8、補正の内容 別紙のとおり

